

# 亚洲玉米螟神经肽羽化激素基因 cDNA 的克隆及组织表达

魏兆军<sup>1</sup>, 魏洪义<sup>2</sup>, 洪桂云<sup>1</sup>, 李娟<sup>1</sup>, 姜绍通<sup>1</sup>, 罗建平<sup>1</sup>

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009;

2. 江西农业大学农学院, 南昌 330045)

**摘要:**羽化激素对调节昆虫的蜕皮和发育起关键作用。亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 是亚洲农业重要害虫之一, 本实验研究了亚洲玉米螟羽化激素基因 cDNA 的分子结构和表达模式。利用兼并性引物 RT-PCR 技术, 克隆了亚洲玉米螟羽化激素基因 cDNA 的中间片段, 然后再用 RACE 方法, 获得羽化激素基因的 cDNA 全长序列。结果表明: 亚洲玉米螟羽化激素基因 cDNA 全长 986 bp (GenBank 登录号: DQ668369), 开放阅读框为 267 bp, 编码 88 个氨基酸的前体蛋白, 其中包括前 26 个氨基酸组成的信号肽和 62 个氨基酸的成熟肽。亚洲玉米螟羽化激素基因与烟草天蛾、棉铃虫和家蚕已报道同源基因的同源性较高, 分别为 79.5%、77.3% 和 67.0%, 与黑腹果蝇同源基因的同源性最低, 仅 45.5%。亚洲玉米螟羽化激素基因 mRNA 只在脑中表达, 在咽下神经节、胸神经节、腹神经节等神经组织中检测不到, 在非神经组织中如中肠、脂肪体和表皮中也不表达。

**关键词:**亚洲玉米螟; 羽化激素; RACE; 组织表达

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)04-0323-07

## Molecular cloning and tissue expression of the cDNA of the gene encoding eclosion hormone in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae)

WEI Zhao-Jun<sup>1</sup>, WEI Hong-Yi<sup>2</sup>, HONG Gui-Yun<sup>1</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, JIANG Shao-Tong<sup>1</sup>, LUO Jian-Ping<sup>1</sup> (1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 2. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** Eclosion hormone (EH), one of the neuropeptides, serves as a critical factor in the control of ecdysis behavior and development in insects. The Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Osf) is one of the major agricultural pests in Asia. In this study, the molecular characterizations and tissue expression of the eclosion hormone gene in *O. furnacalis* were elucidated. Using degenerate primers and RT-PCR method, the middle part of the cDNA of EH gene from *O. furnacalis* was cloned and sequenced. The full-length cDNA of EH gene was then obtained with rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. The full Osf-EH cDNA is 986 bp (GenBank accession no. DQ668369), containing a 267 bp open reading frame encoding an 88-amino acid preprohormone. After translation, the preprohormone was cleaved to a hydrophobic 26-amino acids signal peptide and a 62-amino acids mature peptide. The Osf-EH shows high identity with those from *Manduca sexta* (79.5%), *Helicoverpa armigera* (77.3%) and *Bombyx mori* (67.0%), but low identity with that of *Drosophila melanogaster* (45.5%). RT-PCR analysis showed that the EH mRNA only expressed in the brain, and was not be detected in other neural tissues, such as subesophageal ganglion, thoracic ganglion, abdominal ganglion, and non-neural tissues, such as midgut, fat body and epidermis.

**Key words:** *Ostrinia furnacalis*; eclosion hormone; RACE; tissue expression

昆虫神经肽在调节昆虫的生长、发育、变态、生殖、节律、滞育、行为和认知等方面都起着重要的调节作用(Nassel, 2002)。昆虫神经肽种类较多,每种神经肽具有一种或多种功能。羽化激素(eclosion hormone, EH)是由脑神经细胞合成,通过心侧体释放到中枢神经系统和血淋巴中,与蜕皮触发激素(ecdysis-triggering hormone)协调作用,调控昆虫幼虫蜕皮、蛹羽化和成虫生长发育(Zitnan *et al.*, 1996)。此外,羽化激素还具有多种生物学功能,如在烟草天蛾中,羽化激素调节潜成虫翅伸展性的提高、鞣化激素的释放和刺激威氏腺的分泌活动(Hewes and Truman, 1991);羽化激素通过作用于腹部神经球引起羽化行为(Truman *et al.*, 1981)直接或间接促进蜕皮触发激素的释放(Zitnan *et al.*, 1996)。因此,开展昆虫神经肽羽化激素基因的研究对进一步调节昆虫蜕皮和发育具有重要理论价值。

羽化激素最初是从烟草天蛾 *Manduca sexta* (Kataoka *et al.*, 1987; Marti *et al.*, 1987)和家蚕 *Bombyx mori* (Kono *et al.*, 1987)的头部和心侧体中纯化出来的,在这2种昆虫中,羽化激素均为62个氨基酸的神经肽,同时也发现了N端2个氨基酸残基被截去的分子。羽化激素广泛存在于其他昆虫中,如埃及伊蚊、黄粉虫等昆虫中也存在羽化激素基因的核心序列(Horodyski, 1996)。目前,利用分子生物学方法,已经明确烟草天蛾(Horodyski *et al.*, 1989)、家蚕(Kamito *et al.*, 1992)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Horodyski *et al.*, 1993)和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Zhang and Xu, 2006)羽化激素的cDNA全长序列,编码的成熟肽的氨基酸同源率为59%~84%。这4种昆虫尽管分类学地位不同,但其羽化激素成熟肽具有一些共同特点,如每条肽链在其保守位点都含有6个半胱氨酸,分子内形

成3个二硫键,二硫键对于羽化激素的生物活性是非常重要的,它的减少可以使羽化激素完全失活;成熟肽的N末端上游具有长度不同的信号肽。

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 属于鳞翅目螟蛾科,是我国乃至亚洲玉米生产危害最大的害虫。利用神经肽来调控昆虫的生长发育,从而达到控制害虫的目的,已经越来越引起人们的注意(许可等, 2001)。明确亚洲玉米螟羽化激素的分子结构,可为进一步明确羽化激素的合成、储存、释放及受体等奠定基础,进而可以达到利用其控制玉米螟危害的目的。

本实验根据已知的昆虫羽化激素基因的cDNA序列,设计兼并引物进行PCR扩增,获得亚洲玉米螟羽化激素基因cDNA的中间部分序列,然后再利用RACE方法,克隆并测定了亚洲玉米螟羽化激素基因cDNA的全长序列,并对亚洲玉米螟羽化激素基因cDNA的结构特点、同源性进行分析,最后分析了羽化激素基因mRNA水平的组织分布模式。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

亚洲玉米螟老熟幼虫采自广州郊区玉米地,室内打破滞育,用人工饲料连续饲养。饲养室光周期为14L:10D,温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,相对湿度为60%~70%。5龄幼虫的脑、咽下神经节、胸神经节、腹神经节等组织在冰浴条件下解剖,  $-70^\circ\text{C}$ 保存,用于抽提总RNA。

### 1.2 克隆策略及引物设计

克隆策略是首先利用PCR方法扩增出中间片段,然后再根据中间片段设计出特异性引物扩增两端(图1)。扩增羽化激素中间片段的简并性引物为EH1(5'-ATGGAA AT(C/T) TGCATCGAGAACTG-3')和

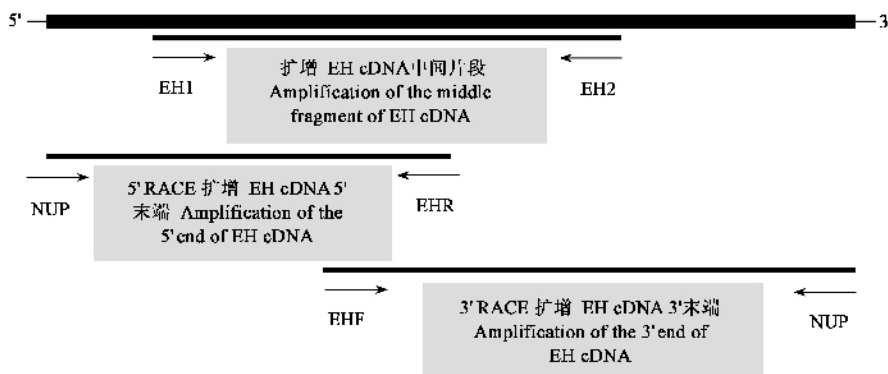


图1 亚洲玉米螟羽化激素全长基因克隆策略

Fig. 1 The strategy of cloning the full-length of eclosion hormone cDNA from *Ostrinia furnacalis*

EH( 5'-GAA( A/G )GC( A/C )G( A/C )T/G )ATGGA( T/ A )GCCA AG-3' ) , 扩增 cDNA 5' 端的引物为 EHR( 5'- GAACTTGATGCAGGATTTCAG-3' ) 和通用引物 NUP( 5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' ) , 扩增 cDNA 3' 端的引物为 EHF( 5'-CGCGCAATGCAAAAAGATGC- 3' ) 和通用引物 NUP。

1.3 RT-PCR

取 30 头玉米螟的 5 龄幼虫的脑组织 , 参考 Wei 等( 2004 , 2005 ) 方法采用异硫氰酸胍和酚、氯仿一步法抽提总 RNA。取 1  $\mu$ g 总 RNA 合成 cDNA 第 1 链 , 与 0.5  $\mu$ g 的 Oligo dT 在 65℃ 条件下变性 10 min ; 冰置 5 min ; 利用 AMV( TaKaRa ) 1  $\mu$ L 42℃ 条件下反应 1 h 合成 cDNA 第 1 链。中间片段的 PCR 反应条件为 : 94℃ 预变性 5 min ; 94℃ 变性 1 min、50℃ 复性 1 min、72℃ 延伸 1 min , 35 个循环 ; 然后再 72℃ 延伸 10 min。2% 的琼脂糖凝胶电泳后 , 在紫外光条件下检测产物 , 用 PCR 产物回收试剂盒( Axygen ) 回收目的条带。

1.4 RACE 反应

根据 RACE 试剂盒( SMARTTM kit , Clontech ) 说明书 , 利用 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增玉米螟羽化激素 cDNA 的两端。首先分别取 1  $\mu$ g 总 RNA 合成 5' 端 cDNA 和 3' 端 cDNA , 再取 2.5  $\mu$ L 作为模板 , 进行 RACE 反应。5'-RACE 反应时先用 UPM ( Universal Primer Mix , Clontech ) 和 EHR 进行第 1 次 PCR 反应 , 再取该 PCR 产物作为模板 , 用 NUP( Nested Universal Primer , Clontech ) 和 EHR 进行第 2 次 PCR 反应 ; 3'-RACE 反应时先用 UPM 和 EHF 进行第 1 次 PCR 反应 , 取产物作为模板再用 NUP 和 EHF 进行第 2 次 PCR 反应。PCR 反应条件为 : 94℃ 预变性 5 min ; 94℃ 变性 30 s , 60℃ 复性 30 s , 72℃ 延伸 60 s , 30 个循环 ; 再 72℃ 延伸 10 min。用 PCR 产物回收试剂盒( Axygen ) 回收目的条带。

1.5 克隆及序列测定

根据 TA 克隆的原理 , 纯化后的 PCR 产物直接与 pMD18-T 载体( TaKaRa ) 连接 , 体系为 PCR 2.5  $\mu$ L、Ligation Mix 3.5  $\mu$ L、pMD18-T 1  $\mu$ L , 16℃ 连接 1 h 以上。取连接混合物 2  $\mu$ L 加到 200  $\mu$ L 制备的 XL-1 感受态细胞中进行转化 ; LB 培养板培养 12 h 以上 , 挑取单菌落培养。然后进行质粒 DNA 抽提及 PCR 鉴定 , 筛选出阳性克隆。取阳性克隆的菌液直接送 Invitrogen 生物技术公司测序。

1.6 序列分析

DNA 序列比较分析主要用 DNASTar , 或利用

NCBI 和 Multalin 网页在线分析 , 同源性比较主要采用 ClustalW 软件 , 分子系统树的构建主要运用 MEGA3.1 软件 , 构建方法采用邻接法 ( NJ 法 ) , 最小进化法 ( ME 法 ) 和不加权组平均法 ( UPGMA 法 ) ( Kumar *et al.* , 2004 )。

1.7 亚洲玉米螟羽化激素 mRNA 的组织分布检测

解剖收集亚洲玉米螟 5 龄幼虫的不同组织 , 抽提总 RNA , 取 1  $\mu$ g 总 RNA 同样条件下进行反转录 , 根据亚洲玉米螟羽化激素 cDNA 全长序列设计引物 EH5( 5'-CAAGTCTATAAACAATCGAC-3' ) 和 EH3( 5'-ATGGGCCACGCGTATGAAGT-3' ) , 进行 PCR 反应 , 目的片段长度约 680 bp , 紫外光条件下检测 , 判断羽化激素 mRNA 的组织分布。

2 结果与分析

2.1 亚洲玉米螟羽化激素 cDNA 的克隆

根据烟草天蛾、家蚕、棉铃虫及果蝇的羽化激素 cDNA 序列 , 设计兼并性引物 EH1 和 EH2 , PCR 扩增出 1 条约 150 bp 的条带( 图 2 : A ) , 符合预期估计。回收克隆后测序 , 获得 144 bp 的序列 , 经 NCBI 数据库 Blast 检索 , 与烟草天蛾、棉铃虫、家蚕等羽化激素 cDNA 的同源性非常高 , 应该是亚洲玉米螟的羽化激素序列。根据中间片段的序列 , 设计特异性引物 EHR 和 EHF , 分别和 UPM 进行 1 次 PCR 反应 , 然后再用 NUP 引物进行 2 次 PCR , 结果显示 5'-RACE 产物在 0.25 kb ~ 0.50 kb 间有 1 条特异性亮带 , 3'-

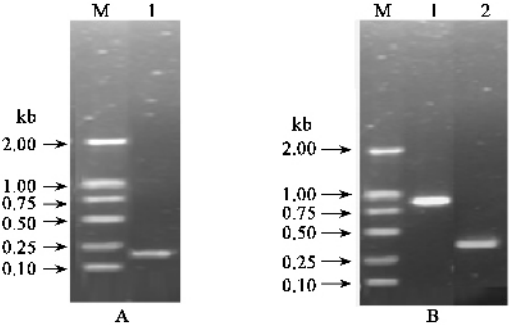


图 2 PCR 产物电泳检测

Fig. 2 PCR amplification of eclosion hormone gene in *Ostrinia furnacalis*

A : 中间片段扩增结果 The result of amplification of middle part of eclosion hormone cDNA ; B : RACE 扩增结果 The result of RACE. M : 分子量标准 Molecular weight marker ; 1 : 3'-RACE PCR 产物 The result of 3'-RACE ; 2 : 5'-RACE PCR 产物 The result of 5'-RACE.

RACE 产物在 1.00 kb ~ 0.75 kb 间有 1 条明亮的条带(图 2:B),分析认为是预期的产物,回收克隆后进行序列测定。

### 2.2 亚洲玉米螟羽化激素 cDNA 全长序列分析

测序结果表明,5'-RACE 获得 261 bp 的 5'末端序列,3'-RACE 产物长度 795 bp。2 个片段经拼接获得玉米螟羽化激素的包括多聚腺苷酸尾在内全长为 986 bp 的 cDNA 序列(GenBank 登录号:DQ668369),其中重叠 70 bp。利用 DNASTar 软件分

析表明,玉米螟羽化激素基因开放阅读框(open reading frame, ORF)为 267 个碱基,编码 88 个氨基酸的前体蛋白。起始密码子 ATG,上游有 60 bp 的 5'端非编码区,终止密码子为 TAA,下游为 659 bp 的 3'端非编码区。通过与家蚕、烟草天蛾、棉铃虫比较,亚洲玉米螟羽化激素前体蛋白的 88 个氨基酸中,前 26 个氨基酸为信号肽序列,含有大量的丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、苯丙氨酸(F)等疏水氨基酸,成熟肽由 62 个氨基酸构成。



图 3 亚洲玉米螟羽化激素基因 cDNA 全长序列及预测的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of eclosion hormone cDNA in *Ostrinia furnacalis*

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 用阴影显示;信号肽结束处用垂直的箭头表示;两个 poly(A) 加尾信号用黑体字表示;序列下方的箭头代表进行 PCR 时所使用的不同的引物的位置和方向;EH1 和 EH2 为兼并性引物,EHF、EHR、EH5 和 EH3 为特异性引物。The suggested start codon(ATG) and stop codon(TAA) are indicated in shade. The vertical arrow shows the end of the signal peptide. The polyadenylation signals are shown in bold type. Arrows below the nucleotide sequence represent the position of the different synthetic primers used in PCR. Degenerate primers are EH1 and EH2, and the specific primers for RACE and PCR are EHF, EHR, EH5 and EH3.

### 2.3 亚洲玉米螟与其他昆虫的羽化激素 cDNA 的同源性分析

比较 5 种昆虫的羽化激素基因 ORF 的核苷酸,起始密码子均为 ATG,但终止密码子存在一定的差异,亚洲玉米螟、家蚕、烟草天蛾和棉铃虫的终止密码子均为 TAA,而果蝇的为 TGA,且前 4 种昆虫的羽化激素基因的 ORF 都由 267 个核苷酸组成,而果蝇的 ORF 有 294 个核苷酸;序列的 142 到 294 之间保守性明显高于其他位置(核苷酸比较结果图未显示),与氨基酸的比较结果一致(图 4),该区域编码

羽化激素成熟肽序列,成熟肽的高度保守性也暗示了物种间羽化激素功能的保守性。

同源性分析结果表明,亚洲玉米螟羽化激素编码区域的核苷酸和氨基酸均与烟草天蛾的同源性最高,分别为 80.1% 和 79.5%,与果蝇的同源性最低,分别为 38.6% 和 45.5%(图 4)。上述同源性结果与形态学分类结果基本相近,这 5 种昆虫除果蝇属于双翅目(Diptera)外,其余均为鳞翅目(Lepidoptera)昆虫,其中亚洲玉米螟、棉铃虫、烟草天蛾和家蚕分属于螟蛾科、夜蛾科、天蛾科和蚕蛾科。

比较 5 种昆虫羽化激素的氨基酸序列,果蝇与亚洲玉米螟等其他 4 种昆虫羽化激素不论在 N 末端的长度还是在氨基酸组成上都有不同。果蝇的羽化激素前体由 97 个氨基酸组成,而其他 4 种昆虫的羽化激素前体蛋白都有 88 个氨基酸,但成熟肽区域的

序列保守性还是非常高,且存在 6 个保守的半胱氨酸位点,分别位于成熟肽 48、52、55、68、72 和 83 处,这与羽化激素的二级结构有关,在链内形成二硫键(图 5)。



图 4 5 种昆虫的羽化激素基因 ORF 编码蛋白的氨基酸比较

Fig. 4 Amino acid alignment of the ORF of eclosion hormone cDNA from five insects

Osf: 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*; Bom: 家蚕 *Bombyx mori*; Har: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*; Mas: 烟草天蛾 *Manduca sexta*; Dro: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; 图 5 同 The same for Fig. 5. 黑影代表同源性高的氨基酸;序列后面的数据代表该昆虫与亚洲玉米螟的同源性;与二级结构相关的 6 个保守的半胱氨酸残基用 \* 号标明。Highly conserved residues are shaded. The percentages indicate the homology with *O. furnacalis*. Asterisks show the six conserved cysteine residues.

同源性分析表明昆虫的羽化激素基因是比较保守的,因此可以进一步依此进行系统聚类。依据羽化激素基因 ORF 的氨基酸序列,分别采用邻接法(NJ 法)、最小进化法(ME 法)和不加权组平均法(UPGMA 法)构建了 5 种昆虫的系统发育树,选择了 p-distance 参数,自举检验 1 000 次。3 种发育树的结果比较一致(图 5),棉铃虫和烟草天蛾的亲缘关系最近,二者聚为一类后,与玉米螟和家蚕再进行聚类;果蝇在 3 种系统树中,与其他 4 种昆虫的关系最远:这与它们的形态系统发育关系是类似的。

2.4 亚洲玉米螟羽化激素 mRNA 的组织分布

亚洲玉米螟不同组织 1 μg 的总 RNA 被用来进行 RT-PCR 分析,结果显示:仅在脑部出现了明显的 680 bp 的条带,而在其他神经组织,如咽下神经节、胸神经节、腹神经节中都检测不到,在非神经组织如中肠、脂肪体和表皮中也没有明显的阳性条带(图 6)。这说明亚洲玉米螟的羽化激素 mRNA 仅仅在脑部表达,在其他组织中不表达。

3 讨论

本实验利用兼并性引物和 RACE 方法,克隆并测定了亚洲玉米螟羽化激素基因 cDNA 的全长序列。该序列由 986 个碱基组成,编码区有 267 个核苷酸,编码了 88 个氨基酸的蛋白质前体。与已知的 4 种昆虫的羽化激素 cDNA 序列相比,亚洲玉米螟

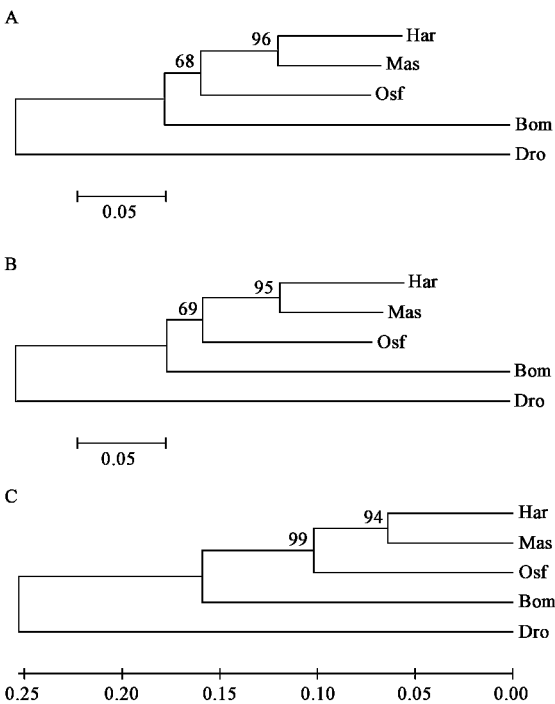


图 5 5 种昆虫基于羽化激素基因序列的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic trees of five insects based on the sequences of eclosion hormone genes

A: 邻接法 NJ method; B: 最小进化法 ME method; C: 不加权组平均法 UPGMA method.

的羽化激素 cDNA 3'端非编码区的长度明显长于其他昆虫,poly( A)尾巴除外,亚洲玉米螟的 3'端非编码区为 627 bp,而棉铃虫为 478 bp( Zhang and Xu, 2006) 这可能与羽化激素基因在物种间的进化有

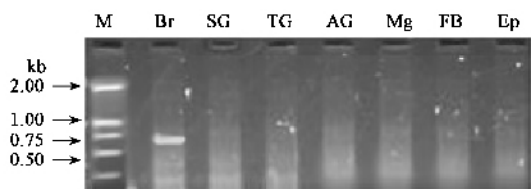


图6 亚洲玉米螟羽化激素 mRNA 的组织分布 RT-PCR 检测

Fig. 6 Tissue distribution of eclosion hormone

mRNA in *Ostrinia furnacalis*

M: 标准分子量 DNA marker; Br: 脑 Brains; SG: 咽下神经节 Subesophageal ganglia; TG: 胸神经节 Thoracic ganglia; AG: 腹神经节 Abdominal ganglion; Mg: 中肠 Midgut; FB: 脂肪体 Fat body; Ep: 表皮 Epidermis.

关。亚洲玉米螟与鳞翅目的烟草天蛾、棉铃虫和家蚕的羽化激素基因同源性比较高,分别达到 79.5%、77.3% 和 67.0% 这种序列高度的保守性也暗示功能上的保守性。另外,亚洲玉米螟的羽化激素 mRNA 只在脑中表达,与烟草天蛾(Horodyski *et al.*, 1989) 家蚕(Kamito *et al.*, 1992) 果蝇(Horodyski *et al.*, 1993) 和棉铃虫(Zhang and Xu, 2006) 的同源基因的表达模式基本一致。迄今,烟草天蛾和家蚕的羽化激素功能研究得最清晰,亚洲玉米螟羽化激素的具体功能还没有明确。

亚洲玉米螟羽化激素的成熟肽由 62 个氨基酸构成,与家蚕、棉铃虫和烟草天蛾的长度一致,比果蝇的短 9 个氨基酸,但是 5 种昆虫的成熟肽均包含 6 个保守的 Cys 残基,6 个 Cys 残基在链内可以形成 3 个二硫键,这种保守的二级结构对保持羽化激素的活性相当重要(Kataoka *et al.*, 1992)。Kikuchi 等(1997)通过点突变,分析认为家蚕羽化激素中 Glu<sup>12</sup>、Met<sup>24</sup> 和 Phe<sup>25</sup> 三个位点对保持羽化激素的生物活性起关键作用,Nosaka 等(1998)研究认为家蚕羽化激素 N 端的 34 个氨基酸中 Ala<sup>10</sup> 至 Gln<sup>20</sup> 存在  $\alpha$ -螺旋,Fujita 等(1998)进一步分析发现家蚕羽化激素全长存在 3 个  $\alpha$ -螺旋,Phe<sup>29</sup>, Ile<sup>55</sup>, Phe<sup>58</sup> 和 Leu<sup>59</sup> 位点对于维持羽化激素的生理活性具有构建作用。利用尿素和  $\beta$ -2 巯基乙醇把羽化激素变性后,羽化激素的生理功能降低到 47%,但蛋白折叠异构酶(protein disulfide isomerase)与其作用后,又可以恢复羽化激素的生理功能(Fujita and Yoshida, 2001)。亚洲玉米螟羽化激素活性位点及对维持功能的二级结构还有待于进一步研究。

昆虫蜕皮与变态的相关调控基因是进行害虫生物防治的重要靶基因(李庆荣等, 2006),利用神经肽(徐卫华, 2006)和神经内分泌(王方海等, 2004)调节昆虫蜕皮与变态,从而进行害虫防治已经越来越得

到重视。本研究明确了亚洲玉米螟羽化激素基因的 DNA 分子结构和 mRNA 水平的组织分布,具有重要的理论意义。我们还将进一步从玉米螟的蜕皮发育入手,通过对羽化激素的合成、储存、释放、受体结合及信号通路等过程的干扰,使得亚洲玉米螟内分泌系统失去平衡,体内激素水平产生永久或严重的失调,导致生理机能障碍以至中断正常的昆虫活动,从而达到防治玉米螟的目的。

## 参 考 文 献 (References)

- Fujita N, Maekawa T, Ohta S, Kikuchi T, 1998. The functional residues and their representation by a hypothetical 3D model of silkworm eclosion hormone. *Protein Eng.*, 11(9): 769–773.
- Fujita N, Yoshida M, 2001. Efficient folding of the insect neuropeptide eclosion hormone by protein disulfide isomerase. *J. Biochem. (Tokyo)*, 130(5): 575–580.
- Hewes RS, Truman JW, 1991. The role of central and peripheral eclosion hormone release in the control of the ecdysis behavior in *Manduca sexta*. *Comp. Physiol.*, 168: 697–707.
- Horodyski FM, Ewer J, Riddiford LM, Truman JW, 1993. Isolation, characterization and expression of the eclosion hormone gene of *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.*, 215(2): 221–228.
- Horodyski FM, Riddiford LM, Truman JW, 1989. Isolation and expression of the eclosion hormone gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8123–8127.
- Horodyski FM, 1996. Neuroendocrine control of insect ecdysis by eclosion hormone. *J. Insect Physiol.*, 42: 917–924.
- Kamito T, Tanaka H, Sato B, Nagasawa H, Suzuki A, 1992. Nucleotide sequence of cDNA for the eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*, and the expression in a brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182(2): 514–519.
- Kataoka H, Li JP, Lui AS, Kramer SJ, Schooley DA, 1992. Complete structure of eclosion hormone of *Manduca sexta*: Assignment of disulfide bond location. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 39(1): 29–35.
- Kataoka H, Troetschler RG, Kramer SJ, Cesarin BJ, Schooley DA, 1987. Isolation and primary structure of the eclosion hormone of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146(2): 746–750.
- Kikuchi T, Okamoto M, Geiser M, Schmitz A, Gohda K, Takai M, Morita T, Horii K, Fujita N, 1997. Prediction of the biologically active sites in eclosion hormone from the silkworm, *Bombyx mori*. *Protein Eng.*, 10(3): 217–222.
- Kono T, Nagasawa H, Kataoka H, Isogai A, Fugo H, Suzuki A, 1987. Amino acid sequence of eclosion hormone of the silkworm. *Agric. Biol. Chem.*, 51: 2307–2308.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150–163.
- Li QR, Deng XJ, Yang WY, Huang ZJ, Zhong YJ, Cao Y, Xia QY, 2006. Genetic regulators involved in ecdysone-induced programmed cell death

in *Drosophila*. *Acta Entomologica Sinica*, 49( 1 ): 118 – 125. [ 李庆荣, 邓小娟, 杨婉莹, 黄志君, 钟仰进, 曹阳, 夏庆友, 2006. 果蝇蜕皮激素诱导程序性细胞死亡的遗传调控因子. *昆虫学报*, 49( 1 ): 118 – 125 ]

Marti T, Takio K, Walsh K, Terzi G, Truman JW, 1987. Microanalysis of the amino acid sequence of the eclosion hormone from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *FEBS Lett.*, 219( 2 ): 415 – 418.

Nassel DR, 2002. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiol.*, 68( 1 ): 1 – 84.

Nosaka AY, Kanaori K, Umemura I, Takai M, Fujita N, 1998. Structural study on silkworm eclosion hormone fragment ( 1 – 34 ) in solution by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bioorg. Med. Chem.*, 6( 4 ): 465 – 472.

Truman JW, Taghert PH, Copenhaver PF, 1981. Eclosion hormone may control all ecdyses in insects. *Nature*, 291: 70 – 71.

Wang FH, Liu YP, Zhang QX, Chen HQ, Li GH, 2004. Neuroendocrine mechanisms regulating locust phase polymorphism. *Acta Entomologica Sinica*, 47( 5 ): 652 – 658. [ 王方海, 刘永平, 张琼秀, 陈惠卿, 李广宏, 2004. 蝗虫多型现象的神经内分泌调控. *昆虫学报*, 47( 5 ): 652 – 658 ]

Wei ZJ, Zhang QR, Kang L, Xu WH, Denlinger DL, 2005. Molecular characterization and expression of prothoracicotropic hormone during development and pupal diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol.*, 51( 6 ): 691 – 700.

Wei ZJ, Zhang TY, Sun JS, Xu AY, Xu WH, Denlinger DL, 2004. Molecular cloning, developmental expression, and tissue distribution of the gene encoding DH, PBAN and other FXPRL neuropeptides in *Samia cynthia ricini*. *J. Insect Physiol.*, 50( 12 ): 1 151 – 1 161.

Xu K, Tang M, Shen LH, Xu WH, 2001. Advance of physiology and biochemistry in insect molting behavior. *Acta Entomologica Sinica*, 44( 2 ): 244 – 251. [ 许可, 唐明, 沈璐辉, 徐卫华, 2001. 昆虫蜕皮行为的生理生化和分子生物学研究进展. *昆虫学报*, 44( 2 ): 244 – 251 ]

Xu WH, 2006. Advances in insect physiology, biochemistry and molecular biology in the last three years in China mainland. *Acta Entomologica Sinica*, 49( 2 ): 315 – 322. [ 徐卫华, 2006. 近三年来国内昆虫生理生化与分子生物学重要研究进展评述. *昆虫学报*, 49( 2 ): 315 – 322 ]

Zhang M, Xu WH, 2006. Isolation of an eclosion hormone gene from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: temporal and spatial distribution of transcripts. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 143( 3 ): 351 – 359.

Zitnan D, Kingan TG, Hermesman JL, Adams ME, 1996. Identification of ecdysis-triggering hormone from an epitracheal endocrine system. *Science*, 271( 5 245 ): 88 – 91.

( 责任编辑：黄玲巧 )